

09/486037 5

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 AOUT 1998

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>20 AOUT 1997</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>L-97 10635 -</b> DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>L-97</b> DATE DE DÉPÔT <b>20 AOUT 1997</b>	1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  CABINET GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06
--	---

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non	n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone APL/B05B2834FR 04 72 69 84 30
--	--

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**MILIEU DE CULTURE ET D'IDENTIFICATION SPECIFIQUE DE C. ALBICANS ET C. TROPICALIS**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN ..... code APE-NAF ..... Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination  <b>BIO MERIEUX</b>	Forme juridique  <b>SOCIETE ANONYME</b>
Nationalité (s) <b>FRANCAISE</b> Adresse (s) complète (s)  <b>CHEMIN DE L'ORME 69280 MARCY L'ETOILE</b>	Pays  <b>FRANCE</b>

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande
1717			

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° ..... date ..... n° ..... date .....	8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription)  Philippe MAUREAU CPI 921171	SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION <b>A. CHAPELAN</b>	SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI
---	--	---	---

loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR**

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

**DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS**

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

97 10635

**TITRE DE L'INVENTION :**

Milieu de culture et d'identification spécifique de **C. ALBICANS**  
et **C. TROPICALIS**

**LE(S) SOUSSIGNÉ(S)**

**CABINET GERMAIN & MAUREAU**  
**B.P. 6153**  
**69466 LYON CEDEX 06**

**DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

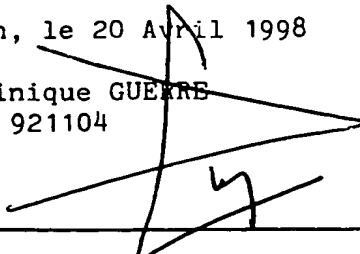
**ORENGA** Sylvain  
Saint-André  
01160 NEUVILLE-SUR-AIN

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Lyon, le 20 Avril 1998

Dominique GUERRE  
CPI 921104



La présente invention concerne un milieu de culture et d'identification spécifique de levures et un procédé d'analyse microbiologique pour identifier spécifiquement les levures *Candida albicans* et *Candida tropicalis* et/ou différencier les levures *C.albicans* et  
5 *C.tropicalis*.

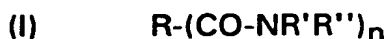
L'espèce *C. albicans* est la plus communément isolée à partir d'échantillons cliniques et provoque des infections plus ou moins importantes de la peau, des ongles et des muqueuses chez les individus présentant des défenses immunitaires normales et des infections très  
10 sérieuses chez les individus affaiblis et notamment ceux infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Selon les études *C. tropicalis* est la deuxième ou troisième espèce en fréquence d'isolement dans les prélèvements d'origine humaine. Il est donc essentiel non seulement de  
15 pouvoir détecter très rapidement la présence de ces levures dans des prélèvements, mais également de différencier celles appartenant à l'espèce *C. albicans*, de celles de l'espèce *C. tropicalis*.

Pour cela, il a été proposé ces dernières années de nombreuses techniques pour identifier rapidement les levures *C.albicans*. Le plus grand nombre d'entre elles est basé sur la mise en évidence d'une activité  
20 hexosaminidase, c'est à dire d'enzymes ayant une activité N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase ou N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminidase ou N-acétyl- $\beta$ -D-mannosaminidase (FR-2 684 110, FR-2 659 982). Néanmoins ces procédés souffrent d'une spécificité réduite vis à vis des levures de l'espèce *C. tropicalis*. Les inventeurs de la présente invention ont  
25 découvert qu'en inhibant une activité enzymatique de l'espèce *C.tropicalis*, notamment l'activité hexosaminidase, il était possible de pallier aux inconvénients des tests précités et ainsi d'apporter un moyen d'identification et/ou de différenciation des levures, notamment de *C. albicans* et *C. tropicalis*, rapide et peu coûteux.

30 L'objet de l'invention est un milieu de culture et d'identification spécifique de levures comprenant un substrat chromogène ou fluorigène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, caractérisé en ce que le milieu comprend en outre au moins un composé sélectivement inhibiteur de l'activité hexosaminidase de  
35 *Candida tropicalis*

Grâce à l'invention, le milieu de culture permet notamment l'identification spécifique des levures de l'espèce *C.albicans* et/ou *C.tropicalis*.

5 Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, le milieu de culture comprend en tant que composé sélectivement inhibiteur une amide de formule (I):

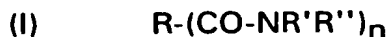


10 dans laquelle R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres:

- un atome d'hydrogène,
  - une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,
  - 15 ou bien chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,
- et n est nombre entier supérieur ou égal à 1.

20 Selon l'invention, par une chaîne hydrocarbonée " comportant " au moins un hétéroatome on entend que la chaîne hydrocarbonée peut être substituée par au moins un substituant tel que notamment -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH, et un atome d'halogène, et/ou peut être interrompue par au moins un hétéroatome tel que notamment O, S, et N.

25 Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, le milieu de culture comprend en tant que composé sélectivement inhibiteur une amide de formule (I):



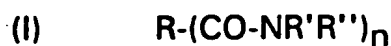
30 dans laquelle R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres:

- un atome d'hydrogène,
- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome,

ou bien chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,

et n est nombre entier supérieur ou égal à 1.

5 Selon un autre mode de réalisation préférentiel de l'invention, le milieu de culture comprend en tant que composé sélectivement inhibiteur une amide de formule (I):



10

dans laquelle R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres:

- un atome d'hydrogène,
- une chaîne hydrocarbonée aliphatique,

15

et n est égal à 1 ou 2.

Selon un mode de réalisation très préférentiel de l'invention, le composé sélectivement inhibiteur est une acétamide.

20

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture comprend un activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase de *C. albicans*.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase est la N-acétyl-glucosamine.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture comprend un mélange de composés sélectivement inhibiteurs.

25

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le mélange de composés sélectivement inhibiteurs est constitué d'acétamide et de formamide.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu est liquide ou gélifié.

30

Selon un mode de réalisation de l'invention, le milieu de culture est gélifié et comprend pour 1 litre :

- |  |            |
|--|------------|
| - peptones ou mélange de peptones      | 0,01-40 g  |
| - extrait de levure                    | 0,01-40 g  |
| - glucose (source de carbone)          | 0-10 g     |
| - tampon phosphate (pH entre 5 et 8,5) | 2,5-100 mM |

35

5 Bromo 4 chloro 3 indolyl-N-acétyl-

$\beta$ -D-glucosaminide	20-600.10 <sup>-6</sup> M
- acétamide	0,01-20g
- inhibiteur de bactéries	0-20g
- agar	11-20 g

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu de culture gélifié ou liquide décrit ci-dessus comprend de plus de la N-acétyl-glucosamine à 1,0 g/l.

Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le milieu de culture gélifié ou liquide décrit ci-dessus comprend de plus de la formamide à 0,5 g/l.

Un autre objet de l'invention est un procédé d'analyse microbiologique pour identifier sélectivement les levures *C. albicans* et/ou *C. tropicalis* et/ou différencier les levures *C. albicans* et *C. tropicalis*, caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon à analyser au contact d'au moins un milieu d'identification décrit ci-dessus.

Par "composé sélectivement inhibiteur de l'activité de l'hexosaminidase de *C. tropicalis*", on entend tout composé capable d'inhiber de manière sélective l'activité de l'hexosaminidase de *C. tropicalis*. Par exemple, les composés de type amide de formule décrite ci-dessus ont la propriété d'inhiber spécifiquement l'activité hexosaminidase des *C. tropicalis*, sans affecter celle des *C. albicans*.

Par "identification", on entend la détection et/ou la quantification.

Par "échantillon", on entend notamment tout prélèvement de type biologique, une souche ou un ensemble de souches de levure isolées par exemple après culture.

On expose ci-après, de manière générale la composition du milieu de culture, exprimée en g/l de milieu final.

Le milieu comprend une base nutritive nécessaire au développement des levures et des inhibiteurs spécifiques de l'hexosaminidase des *C. tropicalis* selon l'invention.

Les éléments constitutifs de la base nutritive comprennent :

- des peptones de 0,01 à 40 g/l, telles que la peptone de viande, le produit commercialisé par la société bioMérieux sous la marque bioSoyase ou analogue, ou encore un mélange de peptones ; de



préférence, la peptone ou le mélange de peptones est présent dans le milieu à environ 6 g/l  $\pm$  0,5 g/l ;

- un extrait de levure de 0,01 à 40 g/l, de préférence environ 1,5 g/l, apportant des vitamines de croissance des levures ;

5                   - une source de carbone, telle que le glucose, le glycérol, un acétate, un pyruvate, un lactate, l'arginine, un aminobutyrate, ou un mélange de ces composants, dans la proportion de 0 à 10 g/l ; la source de carbone est de préférence le glucose en une quantité de 1 g/l ;

10                   - un tampon ajouté au milieu afin d'obtenir un pH favorable pour le développement de *C. albicans*, compris entre 5 et 8,5 ; le tampon est choisi parmi les tampons phosphates, Tris, Hépès (acide N-2-hydroxyéthyl-pipérazine-N'-2-éthasulfonique) et citrate dans la proportion de 2,5 à 100 mM ; de préférence, le tampon est un tampon phosphate 10 mM pour ajuster le pH du milieu à une valeur voisine de 7 ;

15                   - de l'Agar de 11 à 20 g/l, de préférence de 15 g/l.

Le substrat chromogène ou fluorigène peut être tout substrat chromogène ou fluorigène hydrolysable par une hexosaminidase, telle qu'une galactosaminidase, glucosaminidase ou mannosaminidase, pour libérer un produit coloré ou fluorescent. De préférence, le substrat est  
20                   choisi parmi ceux présentant une forte coloration ou fluorescence avec peu de molécules, et n'induisant pas de modification du métabolisme des microorganismes, excepté pour l'activité enzymatique recherchée. Ces substrats sont de préférence choisis, pour les substrats chromogènes, parmi ceux comprenant un groupement chromophore tel qu'un indolye  
25                   substitué ou non, et notamment parmi le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide, 6-chloro-3-indolyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide ou le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide de 20 à 600 mM, avantageusement le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide  
30                   à 200 mM, et pour les substrats fluorigènes, parmi la 4-Méthylumbelliféryl-N-acétyl- $\beta$ -D-galactosaminide, la 4-Méthylumbelliféryl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide.

L'inhibiteur spécifique de l'hexosaminidase des levures de l'espèce *C. tropicalis* est choisi préférentiellement dans le groupe des  
35                   composés de type amide (I) ou leurs mélanges. Il est notamment choisi parmi les amides telles que la formamid , l'acétamide, la propionamide, la

glycinamide, la succinamide, et autres. La quantité du composé de type amide est comprise entre 0,01 et 20 g/l. De préférence l'inhibiteur choisi est l'acétamide à 1 g/l.

5 Afin d'obtenir pour les levures de l'espèce *C. albicans* une activité intense et précoce, il peut avantageusement être ajouté au milieu de culture un activateur d'hexosaminidase tel que décrit dans le brevet FR-2 684 110. De même un inhibiteur ou un mélange d'inhibiteurs des bactéries, permettant d'inhiber la croissance des bactéries à Gram positif et de celles à Gram négatif, sans affecter celle des levures, et si possible  
10 des champignons, peut être ajouté au milieu. De préférence, les inhibiteurs de bactéries sont choisis dans le groupe des antibiotiques tels que gentamicine, chloramphénicol, pénicilline, streptomycine, cycloheximide, néomycine, tétracycline, oxytétracycline ou un mélange d'antibiotiques, et/ou parmi la tellurite, un molybdate et analogues, ou leurs mélanges.  
15 Avantageusement, on choisit le chloramphénicol (0,5 g/l), ou un mélange de gentamicine (0,1 g/l) et de chloramphénicol (0,05 g/l). Il est également possible d'inhiber la croissance des bactéries en diminuant le pH du milieu jusqu'à un pH acide.

20 Comme cela est démontré par les exemples ci-après, la réaction d'hydrolyse enzymatique reste spécifique au delà de 24 heures d'incubation.

#### Exemple 1 :

25 Des essais ont été réalisés pour tester l'effet de l'acétamide sur l'activité hexosaminidase des levures.

Deux milieux ont été préparés selon les techniques habituelles. Le premier milieu ci-après désigné Milieu I contient tous les éléments de la base nutritive, ainsi qu'un substrat chromogène d'une hexosaminidase et  
30 un mélange inhibiteur de bactéries.

La composition du Milieu I pour un litre de milieu final est la suivante :

- bioSoyase (bioMérieux) ..... 6,0 g
- extrait de levure (bioMérieux) ..... 1,5 g
- 35 - glucose (Merck) ..... 1,0 g
- tampon phosphate (Merck) ..... 10,0 mM

- Mn<sup>2+</sup> (Merck) ..... 1,0 mM
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-  
   β-D-glucosaminide (Biosynth) ..... 0,1 g
- gentamicine ..... 0,1 g
- 5 - chloramphénicol..... 0,05 g
- agar (bioMérieux) ..... 15,0 g

Le pH du milieu a été ajusté aux environs de 7.

Le second milieu appelé Milieu II correspond au milieu selon l'invention et contient tous les éléments ci-dessus décrits pour le Milieu I,  
 10 plus l'inhibiteur spécifique de l'hexosaminidase des *C. tropicalis*, c'est à dire un composé acétamide (Sigma) à 1,0 g.

Sur ces deux milieux, 12 souches de levures ont été directement cultivées en boîte de Pétri. Les souches provenant de la collection de la demanderesse, appartiennent aux espèces suivantes : *C. albicans* (3  
 15 souches), *C. glabrata* (2 souches), *C. krusei* (1 souche), *C. parapsilosis* (1 souche), *C. tropicalis* (3 souches), *Saccharomyces cerevisiae* (1 souche), *Trichosporon spp.* (1 souche). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les  
 20 interprétations suivantes :

- les colonies bleues correspondent à des souches produisant la N-acétyl-β-D-glucosaminidase appartenant *a priori* à l'espèce *C. albicans* ;
- les colonies blanches correspondent aux souches ne produisant pas l'enzyme précitée ou dont cette enzyme est inhibée par le composé de  
 25 type amide, elles appartiennent donc à d'autres espèces de levures qui seront alors à identifier à l'aide des techniques habituelles.

TABLEAU I

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	I	1*	2	-	3	-	-
	II	1	2	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	I	-	-	2	-	-	2
	II	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	I	-	-	3	3	-	-
	II	-	-	3	-	1	2
<i>S. cerevisiae</i>	I	-	-	1	-	-	1
	II	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	I	-	-	1	1	-	-
	II	-	-	1	1	-	-

\* : nombre de souches, "-" = 0

5

Comme cela ressort du tableau I ci-dessus, l'apport du composé de type amide permet une détection spécifique des souches de *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans*, ainsi qu'une souche de *Trichosporon* après 48 heures d'incubation uniquement, produisent des colonies colorées sur le milieu selon l'invention. Les colonies de *C. tropicalis* qui sont sur le Milieu I donnent des colonies incolores sur le Milieu II, sauf une très faiblement colorée après 48 heures d'incubation.

10

15

### Exemple 2 :

20

L'expérience de l'exemple 1 a été reproduite mais en utilisant des milieux liquides au lieu de milieux gélifiés. Les milieux III et IV correspondent donc aux milieux I et II de l'exemple 1 mais sont dépourvus d'agar. Par ailleurs, la concentration du 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminide est de 150 mg/l de milieu final pour une utilisation en milieu liquide. Les milieux ont été répartis en ampoules en verre, à raison de 3 ml par ampoule. Les souches étudiées sont les mêmes

que dans l'exemple 1. Une suspension étalonée à 2 MacFarland à l'aide d'un néphélomètre a été effectuée pour chacune des souches directement dans les ampoules contenant les milieux. Les ampoules ainsi inoculées ont été incubées 48 heures à 37°C. Elles ont été examinées après respectivement 24 et 48 heures selon les interprétations de l'exemple 1.

Les résultats sont présentés dans le tableau II ci-après :

TABLEAU II

10

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	III	1*	2	-	3	-	-
	IV	1	2	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	III	-	-	2	-	-	2
	IV	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	III	-	2	1	3	-	-
	IV	-	-	3	-	2	1
<i>S. cerevisiae</i>	III	-	-	1	-	-	1
	IV	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	III	-	-	1	-	1	-
	IV	-	-	1	-	1	-

\* : nombre de souches, "-" = 0

Comme cela ressort du tableau II ci-dessus, l'apport du composé amidé permet une détection spécifique des souches de *C. albicans*. En effet après 24 heures d'incubation, seules les souches de *C. albicans* donnent des tubes colorés en bleu dans le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui donnent des tubes colorés dans le Milieu III donnent des tubes incolores dans le Milieu IV. Après 48 heures d'incubation la coloration des tubes comportant des souches de *C. tropicalis* est également inhibée ou au moins très fortement réduite.

**Exemple 3 :**

Des essais ont été réalisés pour tester l'effet de l'acétamide sur l'activité hexosaminidase des levures en présence d'un activateur spécifique de cette enzyme.

L'expérience de l'exemple 1 a été reproduite mais en ajoutant au milieu de la N-Acétyl-glucosamine. Les milieux V et VI correspondent donc aux milieux I et II de l'exemple 1 auxquels on a ajouté de la N-Acétyl-glucosamine à 1,0 g/l de milieu final. Les souches étudiées sont les mêmes que dans l'exemple 1. Elles ont été directement cultivées en boîte de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations de l'exemple 1.

Les résultats sont présentés dans le tableau III ci-après :

**TABLEAU III**

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	V	2*	1	-	3	-	-
	VI	2	1	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	V	-	-	2	-	-	2
	VI	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	V	-	-	1	-	-	1
	VI	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	V	-	-	1	-	-	1
	VI	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	V	-	-	3	3	-	-
	VI	-	-	3	-	-	3
<i>S. cerevisiae</i>	V	-	-	1	-	-	1
	VI	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	V	-	-	1	1	-	-
	VI	-	-	1	1	-	-

\* : nombre de souches, "-" = 0

Comme cela ressort du tableau III ci-dessus, l'apport du composé de type amide permet une détection spécifique des souches de *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans*, ainsi qu'une souche de *Trichosporon* après 48 heures d'incubation uniquement, produisent des colonies colorées sur le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui sont sur le Milieu V donnent des colonies incolores sur le Milieu VI. L'ensemble de ces deux milieux permet donc également une identification spécifique des levures de l'espèce *C. tropicalis* puisqu'après 48 heures d'incubation, elles sont les seules à être positives sur le milieu V et négatives sur le milieu VI.

#### Exemple 4 :

Des essais ont été réalisés pour tester l'effet d'un mélange de composés amidés sur l'activité hexosaminidase des levures en présence d'un activateur spécifique de cette enzyme.

L'expérience de l'exemple 3 a été reproduite mais en ajoutant au milieu VI de la formamide à 0,5 g/l de milieu final (milieu VIII), le milieu VII étant identique au milieu V de l'exemple 3. Les souches étudiées sont les mêmes que dans l'exemple 3. Elles ont été directement cultivées en boîte de Pétri. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies formées ont été examinées visuellement, respectivement après 24 et 48 heures d'incubation selon les interprétations de l'exemple 1.

TABLEAU IV

Espèces	Milieu	Coloration					
		à 24 heures			à 48 heures		
		Forte	Faible	Nulle	Forte	Faible	Nulle
<i>C. albicans</i>	VII	2*	1	-	3	-	-
	VIII	2	1	-	3	-	-
<i>C. glabrata</i>	VII	-	-	2	-	-	2
	VIII	-	-	2	-	-	2
<i>C. krusei</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>C. parapsilosis</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>C. tropicalis</i>	VII	-	-	3	3	-	-
	VIII	-	-	3	-	-	3
<i>S. cerevisiae</i>	VII	-	-	1	-	-	1
	VIII	-	-	1	-	-	1
<i>Trichosporon</i>	VII	-	-	1	1	-	-
	VIII	-	-	1	-	1	-

5 \* : nombre de souches, "-" = 0

10 Comme cela ressort du tableau IV ci-dessus, l'apport d'un second composé de type amide permet une détection encore plus spécifique des souches de *C. albicans*. En effet, seules les souches de *C. albicans* produisent des colonies significativement colorées sur le milieu selon l'invention. Les souches de *C. tropicalis* qui sont sur le Milieu VII donnent des colonies incolores sur le Milieu VIII et la souche de *Trichosporon* fortement colorée après 48 heures d'incubation sur le milieu VII ne l'est plus que très faiblement sur le milieu VIII.



## REVENDICATIONS

1/ Milieu de culture et d'identification spécifique de levures comprenant un substrat chromogène ou fluorigène, susceptible d'être hydrolysé par une enzyme du groupe des hexosaminidases, caractérisé en  
5 ce que le milieu comprend en outre au moins un composé sélectivement inhibiteur de l'activité hexosaminidase de *C. tropicalis*.

2/ Milieu selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I):



dans laquelle R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres:

- un atome d'hydrogène,
- 15 - une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou cyclique, comportant éventuellement au moins un hétéroatome, ou bien chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,
- 20 et n est nombre entier supérieur ou égal à 1.

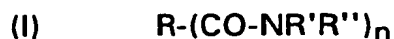
3/ Milieu selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I):



dans laquelle R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des autres:

- un atome d'hydrogène,
- une chaîne hydrocarbonée, saturée ou insaturée, aliphatique ou  
30 cyclique, éventuellement interrompue par au moins un hétéroatome, ou bien chacun des R et/ou R' et/ou R'' forment ensemble une chaîne hydrocarbonée cyclique, saturée ou insaturée, comportant éventuellement au moins un hétéroatome,
- et n est nombre entier supérieur ou égal à 1.

35 4/ Milieu selon les revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une amide de formule (I):



5 autres: dans laquelle R, R' et R'' sont, indépendamment les uns des

- un atome d'hydrogène,
- une chaîne hydrocarbonée aliphatique,
- et n est égal à 1 ou 2.

10 5/ Milieu selon les revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le composé sélectivement inhibiteur est une acétamide.

6/ Milieu selon les revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'il comprend un activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase de *C. albicans*.

15 7/ Milieu selon la revendication 6 caractérisé en ce que l'activateur spécifique de l'enzyme hexosaminidase est la N-acétyl-glucosamine.

8/ Milieu selon les revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comprend un mélange de composés sélectivement inhibiteurs.

20 9/ Milieu selon la revendication 8 caractérisé en ce que le mélange de composés sélectivement inhibiteurs est constitué d'acétamide et de formamide.

10/ Milieu selon la revendications 1 caractérisé en ce que le milieu est liquide ou gélifié.

25 11/ Milieu selon les revendications 1 et 10 caractérisé en ce que le milieu est gélifié et comprend pour 1 litre :

- peptones ou mélange de peptones 0,01-40 g
- extrait de levure 0,01-40 g
- glucose (source de carbone) 0-10 g
- tampon phosphate (pH entre 5 et 8,5), 2,5-100 mM
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-acétyl-  
β-D-glucosaminide (Biosynth) 20-600.10<sup>-6</sup>M
- acétamide (Sigma) 0,01-20g
- inhibiteur de bactéries 0-20g
- agar 11-20 g

35 12/ Milieu selon les revendications 10 et 11 comprenant de plus de la N-acétyl-glucosamine à 1,0 g/l.

13/ Milieu selon les revendications 10 et 12 comprenant de plus de la formamide à 0,5 g/l.

14/ Procédé d'analyse microbiologique pour identifier sélectivement la levure *C. albicans* et/ou *C. tropicalis* et/ou différencier les  
5 levures *C. albicans* et *C. tropicalis*, caractérisé en ce que l'on met directement l'échantillon à analyser au contact d'au moins un milieu d'identification selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

